

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-024012

(43)Date of publication of application : 28.01.2003

(51)Int.Cl.

A23L 1/305

A61K 35/60

A61K 38/00

A61P 3/02

A61P 9/12

A61P 43/00

C07K 5/062

C07K 5/072

C12N 9/99

(21)Application number : 2001-217894

(71)Applicant : NATIONAL INSTITUTE OF
ADVANCED INDUSTRIAL &
TECHNOLOGY
MITSUBISHI GAS CHEM CO INC

(22)Date of filing : 18.07.2001

(72)Inventor : MARUYAMA SUSUMU
AIDA JUON(54) ANGIOTENSIN I CONVERTING ENZYME INHIBITOR AND ANTIHYPERTENSIVE
FUNCTIONAL FOOD

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain an angiotensin I converting enzyme inhibitor having as the active ingredient a peptide derived from a natural product and excellent in absorbency, to provide an antihypertensive functional food having as the active ingredient the peptide, and to provide a nutrient preparation having as the active ingredient the peptide.

SOLUTION: The angiotensin I converting enzyme inhibitor has as the active ingredient a dipeptide such as Ala-Pro existing in a fermentation product obtained by fermenting a fish fresh hydrolyzate or in a fish and shellfish seasoning. The antihypertensive functional food having as the active ingredient the dipeptide and also the nutrient preparation having as the active ingredient the dipeptide are provided.

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号
特開2003-24012
(P2003-24012A)

(43)公開日 平成15年 1月28日 (2003.1.28)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード(参考)
A 2 3 L 1/305		A 2 3 L 1/305	4 B 0 1 8
A 6 1 K 35/60		A 6 1 K 35/60	4 C 0 8 4
	38/00	A 6 1 P 3/02	4 C 0 8 7
A 6 1 P 3/02		9/12	4 H 0 4 5
	9/12	43/00	1 1 1
審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 5 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2001-217894(P2001-217894)

(22)出願日 平成13年 7月18日 (2001.7.18)

(71)出願人 301021533

独立行政法人産業技術総合研究所
東京都千代田区霞が関 1-3-1

(71)出願人 000004466

三菱瓦斯化学株式会社
東京都千代田区丸の内 2丁目 5番 2号

(72)発明者 丸山 進

茨城県つくば市東 1-1-1 独立行政法
人産業技術総合研究所つくばセンター内

(74)代理人 100117891

弁理士 永井 隆

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アンジオテンシン I 変換酵素阻害剤及び血圧降下性機能食品

(57)【要約】

【課題】 天然物由来で、吸収性の良いペプチドを有効成分とするアンジオテンシン I 変換酵素阻害剤、該ペプチドを有効成分とする血圧降下性機能食品、及び該ペプチドを有効成分とする栄養剤を提供する。

【解決手段】 魚肉加水分解物を発酵して得られる発酵産物あるいは魚介調味料に存在するAla-Pro 等のシペプチド類を有効成分とするアンジオテンシン I 変換酵素阻害剤、該ペプチドを有効成分とする血圧降下性機能食品、及び該ペプチドを有効成分とする栄養剤。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 Gly-Pro、Asn-Pro、Ala-Pro、Thr-Pro、Ala-Val、Gly-Val、Asp-Met 及び Asp-Leuからなる群より選ばれる1種以上の魚介類由来のジペプチドを含むことを特徴とするアンジオテンシンⅠ変換酵素阻害剤。

【請求項2】 魚介類由来のAla-Pro を含むことを特徴とするアンジオテンシンⅠ変換酵素阻害剤。

【請求項3】 Gly-Pro、Asn-Pro、Ala-Pro、Thr-Pro、Ala-Val、Gly-Val、Asp-Met 及び Asp-Leuからなる群より選ばれる1種以上の魚介類由来のジペプチドを含むことを特徴とする血圧降下性機能食品。

【請求項4】 魚介類由来のAla-Pro を含むことを特徴とする血圧降下性機能食品。

【請求項5】 Gly-Pro、Asn-Pro、Ala-Pro、Thr-Pro、Ala-Val、Gly-Val、Asp-Met、Asp-Leu、Glu-Ala、Asp-Val、Glu-Met、Phe-Glu、Glu-Ile、Glu-Leu からなる群より選ばれる1種以上の魚介類由来のジペプチドを含むことを特徴とする栄養剤。

【請求項6】 Asn-Pro、Thr-Pro、Ala-Val、Asp-Met 及びAsp-Leu で示されるアミノ酸配列を有する新規なジペプチド。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は魚肉加水分解物の発酵産物中に存在するジペプチド、該ジペプチドを含有するアンジオテンシンⅠ変換酵素阻害剤、該ジペプチドを含有する血圧降下性機能食品及び該ジペプチドを含有する栄養剤に関する。

【0002】

【従来の技術】高血圧症の発症にはレニン-アンジオテンシン系が深くかかわりを有していることが良く知られているが、このレニン-アンジオテンシン系には血管内皮細胞膜などに存在するアンジオテンシンⅠ変換酵素(EC3.4.15.1、以下ACEとも言う)が重要な役割を果たしている。この場合、ACEは、肝臓から分泌されるアンジオテンシノーゲンが腎臓で産生される酵素レニンにより切断されてできるアンジオテンシンⅠ(Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu)に作用し、このものをアンジオテンシンII(Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe)に変換させる。このアンジオテンシンIIは血管平滑筋を収縮させて血圧を高め、さらに副腎皮質に作用してアルドステロンの分泌を促進させるなどの作用を有する。一方、血漿中に存在する酵素カリクレインは蛋白質キニノーゲンを切断することにより、血管を拡張させ降圧させるブラジキニンを産生するが、このブラジキニンはACEの作用により分解され不活性化される。このように、ACEは一方で昇圧性ペプチドであるアンジオテンシンIIを生じさせるとともに、他方で降圧性ペプチドであるブラジキニンを分解することにより、血圧を上昇の方

向に進める。したがって、ACEの活性を抑制することによって血圧上昇を抑制する、あるいは血圧を下げる事が可能である。ACE阻害物質としては蛇毒より得られた数種のペプチドを初めとして、カプトブリル(D-3-mercaptopropanoyl-L-proline)などの合成化合物が多数知られており、カプトブリルなどは高血圧治療薬として使われている。また、近年、種々の食品中から多数のACE阻害ペプチドが見出され、そのうち、牛乳カゼイン、発酵乳、かつおぶし由来のペプチドを添加した食品がそれぞれ特定保健用食品として実用化されている(特公昭60-23085、特公昭61-51562、特公昭61-51564、Biopolymers, 43, 119 (1997)、Biopolymers, 43, 129 (1997))。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】上述のようにアンジオテンシンⅠ変換酵素阻害剤は既に多数報告されているが、血管内への吸収性、安定性がより高く、安価に生産可能なアンジオテンシンⅠ変換酵素阻害剤は医薬品としてのみならず、特定保健用食品の素材としても常に求められている。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは魚介調味料がアンジオテンシンⅠ変換酵素阻害活性を持つほか多数のジペプチド(アミノ酸数が2残基のペプチド)を含有することをふまえて、ペプチドは一般的に消化酵素(プロテアーゼ)の作用を受けて加水分解されやすく不安定であり、一方、分子量が大きいほど腸管から吸収されにくい。しかし、ジペプチドは吸収性が高く、更にプロリンを有しているペプチドは消化管に分泌されるプロテアーゼの作用に抵抗性を示し、安定性が高いことが知られている。そこで、このような優れた性質を持つジペプチドを精製し、その構造を確認することにより、アンジオテンシンⅠ変換酵素阻害活性を持つペプチド及び吸収性に優れたジペプチド混合物を見出し、本発明を完成させるに至った。

【0005】すなわち本発明は(1)Gly-Pro、Asn-Pro、Ala-Pro、Thr-Pro、Ala-Val、Gly-Val、Asp-Met 及び Asp-Leuからなる群より選ばれる1種以上の魚介類由来のジペプチドを含むアンジオテンシンⅠ変換酵素阻害剤、(2)魚介類由来のAla-Pro を含むアンジオテンシンⅠ変換酵素阻害剤、(3)Gly-Pro、Asn-Pro、Ala-Pro、Thr-Pro、Ala-Val、Gly-Val、Asp-Met 及び Asp-Leuからなる群より選ばれる1種以上の魚介類由来のジペプチドを含む血圧降下性機能食品、(4)魚介類由来のAla-Pro を含む血圧降下性機能食品、(5)Gly-Pro、Asn-Pro、Ala-Pro、Thr-Pro、Ala-Val、Gly-Val、Asp-Met、Asp-Leu、Glu-Ala、Asp-Val、Glu-Met、Phe-Glu、Glu-Ile、Glu-Leuからなる群より選ばれる1種以上の魚介類由来のジペプチドを含む栄養剤、及び(6)Asn-Pro、Thr-Pro、Ala-Val、Asp-Me

t 及び Asp-Leu で示されるアミノ酸配列を有する新規なジペプチドに関するものである。以下、本発明を詳細に説明する。

【0006】

【発明の実施の形態】本発明のジペプチドは例えば、魚介類を食塩とともに水に漬け込み、自己消化により、場合によってはプロテアーゼを添加して蛋白分解を促進しながら自己消化させジペプチドを生成させる。この自己消化によるジペプチドの生成は、室温で、プロテアーゼを添加しない場合には通常6〜12月かけて行われる。プロテアーゼを添加する場合には、その添加量に応じて熱成期間を短縮することが出来る。熱成が終了したのち濾別し、ジペプチドを含む上澄液を得る。原料の魚介類としてはイワシ、さば、さけ、ほっけ、きびなど、はたはた、帆立貝、かき、あさり等が挙げられるが、特にイワシが好適な原料である。あるいはこのようにして生産した魚介調味料から単離することが出来る。また、本発明のジペプチドは上記に類似の方法で当該ペプチドと同一のアミノ酸配列部分を含有する他の生物の蛋白質を酵素加水分解し発酵させることによるで得ることもできる。以下に、本発明のジペプチド並びにジペプチド混合物を、イワシを原料として得られた魚介調味料から生産する方法を具体的に説明する。

【0007】上記魚介調味料をゲル濾過カラムに負荷し、30%メタノールで溶出してアンジオテンシンⅠ変換酵素阻害活性を有する画分を回収する。次いで、この画分をイオン交換カラムに負荷して、蒸留水で溶出後、更に0〜1Mの塩化ナトリウムの直線濃度勾配により溶出される活性画分を回収する。上記活性画分を逆相カラムを装填した高速液体クロマトグラフィー(HPLC)に供し、0.1%トリフルオロ酢酸を含む0〜32%のアセトニトリルの直線濃度勾配により分画する。

【0008】回収した活性画分並びにジペプチドを含有する画分を減圧乾固することにより、アンジオテンシンⅠ変換酵素阻害活性を有する本発明のジペプチド並びにジペプチド混合物を得ることが出来る。

【0009】上記のようにして得られた本発明のペプチドのアンジオテンシンⅠ変換酵素阻害活性は、川岸舜朗編「食品中の生体機能調節物質研究法(生物化学実験法38)」(学会出版センター発行)に記載されている方法で測定することが出来る。すなわち、アンジオテンシンⅠ変換酵素に緩衝液を加えたものを酵素溶液、またHippuryl-His-Leuを緩衝液に溶解したものを基質溶液とし、本発明の試料溶液と上記酵素溶液とを混合し、さらに上記基質溶液を加えて酵素反応させて、反応停止後に遊離してくるHippuric acid(馬尿酸)をHPLCにより定量し、阻害率を算出すればよい。

【0010】本発明のジペプチドは塩としても用いることが出来る。本発明のジペプチドまたはその塩は、そのまま、または通常用いられる個体塩、液体塩、乳

化分散剤等により錠剤、粉剤、水和剤、乳剤、カプセル剤等の形に製剤化してアンジオテンシンⅠ変換酵素阻害剤として使用することが出来る。上記塩体としては、水、ゼラチン、澱粉、ステアリン酸マグネシウム、ラクトース、植物油等が挙げられる。また、本発明のジペプチドまたはその塩はさまざまな食品中に添加して機能性食品、特定保健用食品などとして用いることが出来る。かかる食品として、清涼飲料、乳酸飲料、調味料、スープ、チーズ、ハム、菓子類などが挙げられる。

【0011】上記本発明のジペプチドの塩としては、製剤学上許容されうる酸付加塩および塩基付加塩である。製剤学上許容されうる酸付加塩として、例えば、塩酸、硫酸、硝酸、リン酸等の無機酸との塩；ギ酸、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、コハク酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、トリフルオロ酢酸等の有機酸との塩等が挙げられ、また製剤学上許容されうる塩基付加塩としては、例えばナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩；カルシウム塩等のアルカリ土類金属塩；アンモニウム、エタノールアミン、トリエチルアミン、ジシクロヘキシルアミン等のアミン類との塩等が挙げられる。

【0012】本発明のジペプチドを有効成分として含有するアンジオテンシンⅠ変換酵素阻害剤の使用形態としては、例えば静脈注射、直腸投与等の非経口的投与、あるいは経口的投与が例示される。

【0013】アンジオテンシンⅠ変換酵素阻害剤中における本発明のジペプチドの含有量は、その投与経路、剤形によって適宜変更しうるが、例えば、製剤全重量に対して本発明のジペプチドを5〜90重量%、好ましくは10〜60重量%含有させる。また、機能性食品、特定保健用食品に添加して用いる場合には、例えば該食品中における本発明のジペプチドまたはその混合物を0.01〜50重量%含有させる。

【0014】本発明のジペプチドは上記のように精製したジペプチド単体あるいはジペプチド混合物として用いるはかに、原料の魚介調味料から精製することなく、ジペプチド含有魚介調味料としてアンジオテンシンⅠ変換酵素を阻害する機能のある特定保健用食品、機能性食品などとして用いることもできる。

【0015】さらに本発明のジペプチド混合物は吸収性のよい栄養剤として用いることもできる。栄養剤としては、経口栄養剤及び非経口栄養剤があり、非経口栄養剤には輸液や経腸栄養剤等がある。以下、本発明を実施例、試験例に基づいて説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。

【0016】

【実施例】実施例1 アンジオテンシンⅠ変換酵素阻害ジペプチドの精製

魚介調味料10 mlを、セファデックス LH-20 カラム(ファルマシア社、26×900 mm)に負荷し、30%メタノールで溶出し、アンジオテンシンⅠ変換酵素阻害活性(測定

法については後記試験例1に記述)を有する画分(290~300mlの画分)を回収した。次いで、この画分をSPトヨパール650Mカラム(東ソー社、16×650mm)に負荷し、蒸留水で溶出される活性画分(未吸着画分)を回収した。これを更に、DEAEトヨパール650Mカラム(東ソー社、16×650mm)に負荷し、蒸留水で溶出される活性画分A(未吸着画分)、0~1Mの塩化ナトリウムの直線濃度勾配により溶出される活性画分B(0.08Mの塩化ナトリウムで溶出される位置)を回収した。

【0017】この活性画分Aは更にSymmetry C18カラム(ウォーターズ社 3.9×300mm)を用いたHPLCで、0.1%トリフルオロ酢酸を含む0~32%のアセトニトリルの直線濃度勾配溶出により分画した。アセトニトリル濃度7%、8%、10%、11%、12%、12.5%、及び15%付近に溶出される活性画分(それぞれA-1、A-2、A-3、A-4、A-5、A-6、A-7)を得た。

【0018】この活性画分Bは更にSymmetry C18カラム(ウォーターズ社 3.9×300mm)を用いたHPLCで、0.1%トリフルオロ酢酸を含む0~32%のアセトニトリルの直線濃度勾配溶出により分画した。アセトニトリル濃度4%、12%、14%、15%、18%、19%、及び20%付近に溶出される活性画分あるいはジペプチド画分(それぞれB-1、B-2、B-3、B-4、B-5、B-6、B-7、B-8)を得た。

【0019】回収した15種類のジペプチドは、減圧乾固し最終製品とした。これらのジペプチドの構造はアブライドバイオシステムズ社プロテインシーケンサー491型により解析したところ、A-1からA-7のペプチドはそれぞれ順にGly-Pro、Asn-Pro、Ala-Pro、Thr-Pro、Ala-Val、Gly-Val、Val-Proであった。またB-1からB-8のジペプチドはそれぞれ順にGlu-Ala、Asp-Val、Asp-Met、Glu-Met、Phe-Glu、Glu-Ile、Asp-Leu、Glu-Leuであった。B-1からB-8のジペプチドのうちアンジオテンシンI変換酵素阻害活性がみられたジペプチドは、Asp-Met及びAsp-Leuのみであった。

【0020】次に、上記で表されるジペプチドと同一の配列を有する化学合成ジペプチドの下記条件下におけるHPLCピークの保持時間を魚介調味料から得られたジペプチドの保持時間と比較した。

HPLCの条件:

カラム: Symmetry C18 (ウォーターズ社 3.9 × 150 mm)

溶出液: 0.1%トリフルオロ酢酸を含む0~32%のアセトニトリル

【0021】試験例1 アンジオテンシンI変換酵素阻害活性の測定

実施例1におけるアンジオテンシンI変換酵素阻害活性の測定は下記の方法により行った。シグマ社より購入したウサギ肺由来アンジオテンシンI変換酵素を緩衝液

(22mMホウ酸緩衝液、pH8.3)に溶解し、60mU/mlの酵素溶液とした。また、ペプチド研より購入したHip-His-Leu (Hippuryl-L-histidyl-L-leucine)及び塩化ナトリウムを上記ホウ酸緩衝液に溶解し、それぞれ7.6mM、608mMの濃度(反応液中での終濃度はそれぞれ5mM、400mMになる)とし、基質溶液とした。0.5ml容量のプラスチックチューブに、試料溶液15μl、上記酵素溶液50μlを入れ、37℃で5分間保温した後、上記基質溶液125μlを加えよく混合して、37℃で30分の反応を行った。その後、10%トリフルオロ酢酸20μlを添加することにより反応を停止させた。反応停止後、酵素反応により遊離した馬尿酸を下記条件下でHPLCにより定量した。

【0022】HPLC測定条件

カラム: μBondasphere 5 μC8 300Å (ウォーターズ社 3.9 × 150 mm)

溶出液: 0.1%トリフルオロ酢酸を含む0~63%のアセトニトリルの直線濃度勾配(20分)

流速: 1ml/min

検出: 228nmの紫外外部吸収

このような実験を複数回繰り返し、阻害率を次の式より算出した。

$$\text{阻害率} = (A - B) / A \times 100 (\%)$$

【式中、A: 阻害剤を含まない場合の馬尿酸のピーク面積、B: 阻害剤添加の場合の馬尿酸のピーク面積】また、上記阻害率が50%になるペプチド濃度をIC₅₀値で表した。このようにして得られたIC₅₀値を表1に示す。

【0023】

表1

ペプチドの種類	IC ₅₀ 値(μM)
Gly-Pro	355
Asn-Pro	1.4mMで32%阻害
Ala-Pro	29
Thr-Pro	290
Ala-Val	790μMで15%阻害
Gly-Val	790μMで17%阻害

* トニトリルの直線濃度勾配(18分)

流速: 1ml/min

検出: 210nmの紫外外部吸収

化学合成したそれぞれのジペプチドの保持時間は魚介調味料から精製したそれぞれのジペプチドの保持時間と一致した。なお、Gly-Pro、Gly-Val、Ala-Pro、Val-Proで表されるペプチドはThe Journal of Biological Chemistry, Vol.255, p.401 (1980)に記載されたアンジオテンシンI変換酵素阻害ペプチドと同一である。

【0021】試験例1 アンジオテンシンI変換酵素阻害活性の測定

実施例1におけるアンジオテンシンI変換酵素阻害活性の測定は下記の方法により行った。シグマ社より購入したウサギ肺由来アンジオテンシンI変換酵素を緩衝液

(22mMホウ酸緩衝液、pH8.3)に溶解し、60mU/mlの酵素溶液とした。また、ペプチド研より購入したHip-His-Leu (Hippuryl-L-histidyl-L-leucine)及び塩化ナトリウムを上記ホウ酸緩衝液に溶解し、それぞれ7.6mM、608mMの濃度(反応液中での終濃度はそれぞれ5mM、400mMになる)とし、基質溶液とした。0.5ml容量のプラスチックチューブに、試料溶液15μl、上記酵素溶液50μlを入れ、37℃で5分間保温した後、上記基質溶液125μlを加えよく混合して、37℃で30分の反応を行った。その後、10%トリフルオロ酢酸20μlを添加することにより反応を停止させた。反応停止後、酵素反応により遊離した馬尿酸を下記条件下でHPLCにより定量した。

【0022】HPLC測定条件

カラム: μBondasphere 5 μC8 300Å (ウォーターズ社 3.9 × 150 mm)

溶出液: 0.1%トリフルオロ酢酸を含む0~63%のアセトニトリルの直線濃度勾配(20分)

流速: 1ml/min

検出: 228nmの紫外外部吸収

このような実験を複数回繰り返し、阻害率を次の式より算出した。

$$\text{阻害率} = (A - B) / A \times 100 (\%)$$

【式中、A: 阻害剤を含まない場合の馬尿酸のピーク面積、B: 阻害剤添加の場合の馬尿酸のピーク面積】また、上記阻害率が50%になるペプチド濃度をIC₅₀値で表した。このようにして得られたIC₅₀値を表1に示す。

【0023】

表1

ペプチドの種類	IC ₅₀ 値(μM)
Gly-Pro	355
Asn-Pro	1.4mMで32%阻害
Ala-Pro	29
Thr-Pro	290
Ala-Val	790μMで15%阻害
Gly-Val	790μMで17%阻害

Val-Pro

570

Asp-Met

600

Asp-Leu

790 μ M で37% 阻害

【0024】

【発明の効果】本発明により、アンジオテンシンⅠ変換酵素阻害活性を有するジペプチドが提供される。本発明のジペプチドは天然物由来であり、魚介類や魚介調味料*

* から容易に得ることができ、高血圧治療や予防のための医薬品、特定保健用食品の素材として利用することができる。さらに本発明は吸収性のよいジペプチドからなる栄養剤として利用することもできる。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テーマコード(参考)

A 6 1 P 43/00

1 1 1

C 0 7 K 5/062

C 0 7 K 5/062

5/072

5/072

C 1 2 N 9/99

C 1 2 N 9/99

A 6 1 K 37/02

(72)発明者 相田 ジュオン

新潟県新潟市太夫浜字新割182番地 三菱
瓦斯化学株式会社新潟研究所内

F ターム(参考) 4B018 MD20 ME04 MF10 MF12 MF14

4C084 AA02 AA06 BA01 BA08 BA14

BA23 CA45 DC40 MA52 NA14

ZA422 ZC202 ZC212

4C087 AA02 BB29 MA52 NA14 ZA42

ZC20 ZC21

4H045 AA10 BA11 CA50 CA52 DA57

EA23 FA16 GA22 GA23 GA25